



Bioforsk Rapport

Bioforsk Report

Vol.8 Nr.149 2013

Opptak og translokering av insektmidlet imidakloprid fra planteavfall til nektar og pollen i trekkplantene bringebær og solsikker - en mulig eksponeringsvei for pollinerende insekter

Trine Eggen, Sven R. Odenmarck og Torfinn Torp

Bioforsk Vest Særheim og Bioforsk Plantehelse

www.bioforsk.no





Hovedkontor/Head office
Frederik A. Dahls vei 20
N-1432 Ås
Tel.: (+47) 40 60 41 00
post@bioforsk.no

Bioforsk Vest
Bioforsk Særheim
Postveien 92
4353 Klepp st.
Tel.: (+47) 40 60 41 00
Trine.eggen@bioforsk.no

Tittel/Title:

Opptak og translokering av insektmidlet imidakloprid i planteavfall til nektar og pollen i trekkplantene bringebær og solsikker - en mulig eksponeringsvei for pollinerende insekter

Forfatter(e)/Author(s):

Trine Eggen, Sven R. Odenmarck, Torfinn Torp

<i>Dato/Date:</i>	<i>Tilgjengelighet/Availability:</i> Åpen	<i>Prosjekt nr./Project No.:</i> 8381	<i>Saksnr./Archive No.:</i> 2012/393
<i>Rapport nr./Report No.:</i> 8(149) 2013	<i>ISBN-nr./ISBN-no:</i> 978-82-17-01163-7	<i>Antall sider/Number of pages:</i>	<i>Antall vedlegg/Number of appendices:</i>

<i>Oppdragsgiver/Employer:</i> Mattilsynet	<i>Kontaktperson/Contact person:</i> Marit Randall
-----------------------------------------------	-------------------------------------------------------

Stikkord/Keywords:

Norsk: Imidakloprid, Neonikotinoider, Planteavfall, Kompost, Trekkplanter, Nektar, Pollen, Bringebær, Solsikke

English: Imidacloprid, Neonicotinoides, Plant waste, Compost, Bee-attractive plants, Nectar, Pollen, Raspberry, Sunflower

Fagområde/Field of work:

Matsikkerhet, mattrygghet

Food security, food safety

Sammendrag:

I forbindelse med godkjenning av plantevernmidler ønsker Mattilsynet mer kunnskap om pollinerende insekter kan bli eksponert for neonikotinoider i konsentrasjon som kan gi negative effekter. Imidakloprid som er ekstremt giftig for bier, er godkjent for bruk i veksthus og er funnet i planteavfall (høyeste funn 7 µg/g tørrvekt TS) og avrenning fra avfall. Mattilsynet ønsket å avdekke om plantevernmiddelrester i planteavfall og kompost av planteavfall kan opptre i blomstrende kulturplanter i konsentrasjoner som kan medføre uheldig eksponering av pollinerende insekter.

Vekstforsøk med bringebær og solsikke - gode trekkplanter for pollinerende insekter - ble gjennomført i veksthus ved Bioforsk Vest Særheim. Plantene ble dyrket i vekstrenner med torv tilsatt Confidor med aktiv substans imidakloprid, nektar og pollen ble samlet inn og analysert for imidakloprid ved Bioforsk Plantehele og plantevern.

Studien viste at laveste og høyeste imidakloprid-konsentrasjon i nektar og pollen fra bringebær og solsikke som vokste i veksttorv med en imidakloprid-konsentrasjon rundt 28 µg/g TS, var 16,7 - 131,8 ng/g og 25,0 - 26,4 ng/g (bringebær) og 59,0 - 109,6 ng/g og 28,5 - 79,3 ng/g (solsikke).

Med antagelsen at det er lineær sammenheng mellom konsentrasjonsnivå i vekstmedie og i nektar og pollen vil vi, ut fra denne studien, kunne anslå at høyeste beregnet konsentrasjon i nektar vil være 33,0 ng/g for bringebær og 27,4 ng/g for solsikke hvis de hadde vokst i planteavfall/kompost med en imidakloprid-konsentrasjon på 7 µg/g TS (høyeste målte konsentrasjon i avfall fra veksthus). Tilsvarende beregnet antatt høyeste konsentrasjon i pollen vil være 6,6 ng/g og 19,8 ng/g for henholdsvis bringebær og solsikke.

Summary:

The Norwegian Food Safety Authority is interested to find out whether imidacloprid in greenhouse waste can be present in adjacent bee-attractive crops in doses which could adversely affect pollinators. Imidacloprid, a neonicotinoid insecticide known to be highly toxic to bees, is registered for use in greenhouses. Recently, imidacloprid has been found in plant waste/compost (up to 7 µg/g dry weight, DW) and leachates from deposited waste from greenhouse flower production.

The Norwegian Food Safety Authority initiated a project to investigate if bee-attractive plants grown in soil with imidacloprid-residues, e.g. compost waste from greenhouses can take up and translocate imidacloprid to nectar and pollen in concentrations which might cause negative impacts on bees.

Sunflower and raspberry were selected as relevant bee-attractive plants for this study. The study was performed in a greenhouse at Bioforsk Vest Særheim. The plants were cultivated in peat with an initial imidacloprid concentration around 28 µg/g DW in growth-tubes. Nectar and pollen were harvested and analyzed for imidacloprid at Bioforsk Plant Health and Plant Protection. The lowest and highest measured imidacloprid concentrations in nectar and pollen were 16,7 - 131,8 ng/g and 25,0 - 26,4 ng/g, respectively, for raspberry and 59,0 - 109,6 ng/g and 28,5 - 79,3 ng/g, respectively, for sunflowers.

Assuming linear relationship between the concentration in growth media and nectar and pollen the highest estimated nectar concentrations would be 32,95 ng/g (raspberry) and 27,4 ng/g (sunflower) if plants were grown in an imidacloprid concentration at 7 µg/g DW which is the highest measured values in plant waste from greenhouse production reported so far. Corresponding, highest estimated concentration in pollen would be 6,6 ng/g and 19,8 ng/g for raspberry and sunflower, respectively.

Godkjent / Approved

Prosjektleder / Project leader

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Terje Granli".A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Trine Eggen".

Terje Granli

Trine Eggen

Innhold

Sammendrag	2
1. Forord	4
2. Innledning	5
3. Metodikk	7
3.1 Vekstforsøk	7
3.2 Innsamling av nektar og pollen	10
3.3 Analyser	11
3.3.1 Ekstraksjon	12
3.3.2 Instrument analyse (LC-MS/MS)	14
3.3.3 Validering / kvalitetssikring av metode	15
3.4 Statistikk	16
4. Resultat og diskusjon	17
4.1 Vekstmedie	17
4.2 Nektar- og pollenprøver	18
4.3 Reagensblank og validering av metodikk	20
4.4 Vurdering av funn av imidaklorpid	22
5. Konklusjon	24
6. Referanser	25
7. Vedlegg 1. Standardkurve	27
8. Vedlegg 2. Valideringsresultater	28
9. Vedlegg 3. Statistikk vurdering	29

Sammendrag

Insektmidlet imidakloprid er ekstremt giftig for bier og er et av de tre neonikotinoidene som kan ha store negative effekter på bier. Imidakloprid er antatt å være en av flere faktorer som kan være årsak til den omfattende biedøden som er rapportert i flere deler av verden. I forbindelse med godkjenning av plantevernmidler ønsker Mattilsynet kunnskap om pollinerende insekter kan bli eksponert for neonikotinoider i konsentrasjon som kan påføre disse negative effekter.

På oppdrag av Mattilsynet utførte Bioforsk i 2012 et prosjekt for å undersøke om imidakloprid brukt som beisemiddel på raps- og rypsfrø ble overført til nektar og pollen. Prosjektet var finansiering fra Handlingsplan for redusert risiko ved bruk av plantevernmidler. Imidakloprid ble funnet i nektar (5 av 6) og pollen (4 av 4) i konsentrasjoner (opp til 3,1 ng/g) over deteksjonsgrensen (LOD) for analysemetoden. (Eggen og Odenmarck, 2012).

Imidakloprid er godkjent for bruk i veksthus. Undersøkelser for å kartlegge innhold av plantevernmidler i avfallshauger (planter/vekstmedier) og i avrenning fra gartnerier, viser funn av imidakloprid i avfall fra veksthus med blomster samt i alle avrenningsprøver fra avfallshauger (Roseth 2012). Mattilsynet ønsker derfor å avdekke om plantevernmidlerester i planteavfall og kompost av planteavfall kan være en mulig kilde til eksponering av pollinerende insekter i konsentrasjoner som kan medføre negative effekter.

I dette prosjektet ønsket Mattilsynet kunnskap om imidakloprid i vekstmedier kan overføres til nektar og pollen i blomstrende kulturplanter som vokser i veksthusavfall i konsentrasjoner som kan medføre uheldig eksponering av pollinerende insekter.

Forsøk med bringebær og solsikke - gode trekkplanter for pollinerende insekter - ble gjennomført i veksthus og dyrket i vekstrenner med torv med og uten tilsatt imidakloprid.

Studien viste at bringebær og solsikker dyrket i veksttorv tar opp og translokerer imidakloprid til nektar og pollen. Alle nektar- og pollenprøver (totalt 19 prøver) fra vekstrenner tilsatt imidakloprid viste funn av imidakloprid over kvantifiseringsgrensen (LOQ) for analysemetoden. Imidakloprid-konsentrasjonen i nektarprøver var mellom 16,7-131,8 ng/g (9 prøver) for bringebær og mellom 59,0-109,6 ng/g (10 prøver) for solsikke. I pollen fra solsikker og bringebær var imidakloprid-konsentrasjonen henholdsvis mellom 28,5-79,3 ng/g (9 prøver) og 25,0-26,4 ng/g (3 prøve). Det var en trend med høyere nivå i solsikker enn i bringebær, men forskjellen var ikke signifikant. Av total 30 prøver (18 nektar og 12 pollen) fra kontroll-ledd (veksttorv uten imidakloprid), var det funn i 3 pollenprøver i konsentrasjonsområdet 4,3-9 ng/g, som er langt lavere enn i prøver fra behandlede vekstrenner. Krysskontaminering kan ha forekommet blant annet på grunn av fysisk nærhet mellom kontroll og behandlede renner. Dette viser at imidakloprid i behandlede renner er transportert fra veksttorv og opp til nektar og pollen, og det er ikke andre imidakloprid-kilder i forsøket.

Per i dag, er 7 µg/g tørrstoff (TS) den høyeste målte verdien i planteavfall (Roseth 2012, Roseth pers. meddelelse 2013). Den konsentrasjonen er omtrent 4 ganger lavere enn imidakloprid-konsentrasjonen i vår studie. Hvis vi antar en lineær sammenheng mellom

konsentrasjonsnivå i vekstmedie og i nektar og pollen vil vi, ut fra denne studien, kunne anslå at høyeste teoretiske beregnet konsentrasjon i nektar i planter (her: bringebær og solsikke) som vokser i kompost/planteavfall med imidakloprid-konsentrasjon på 7 µg/g TS ha et forventet innhold på henholdsvis 33,0 ng/g og 27,4 ng/g. Tilsvarende estimert imidakloprid-konsentrasjon i pollen er anslått å være 6,0 ng/g og 19,8 ng/g for bringebær og solsikke.

Studien viser at det er behov for mer kunnskap om hvorvidt veksthusavfall kan inneholde imidakloprid-nivåer som kan utgjøre en lokal kilde for uheldig påvirkning av bier - både honningbier, men også villbier.

1. Forord

Mattilsynet ønsker å avdekke om plantevernmiddelrester i planteavfall og kompost av planteavfall kan opptre i blomstrende kulturplanter i konsentrasjoner som kan medføre uheldig eksponering av pollinerende insekter.

Bioforsk har ved kartlegging av avrenning av plantevernmidler fra avfallshauger fra veksthus funnet at imidakloprid er tilstede i nesten alt avfall fra veksthus med blomster, og i til dels i høye konsentrasjoner (Roseth 2010, 2012, 2013). Imidakloprid er mistenkt å være en av flere faktorer som kan være årsak til den omfattende biedøden som er rapportert i flere deler av verden. Siden imidakloprid fortsatt er godkjent til bruk i veksthus, ønsket Mattilsynet mer kunnskap om trekkplanter som vokser i planteavfall/kompost av planteavfall med rester av imidakloprid, kan ta opp og translokere imidakloprid til nektar og pollen i konsentrasjoner som kan medfører uheldig eksponering av pollinerende insekter.

Vi vil takke alle som har bidratt i prosjektet og spesielt vår veksthusteknikkergruppe ved Bioforsk Vest Særheim for et godt gjennomført vekstforsøk.

Vi til også takke Marit Randall i Mattilsynet for godt samarbeid og gode faglige innspill.

Prosjektet er finansiert over Handlingsplanen for redusert risiko ved bruk av plantevernmidler.

2. Innledning

I løpet av de siste årene har det vært flere tilfeller av biedød, og i mange land ser man en nedgang i bestanden av både honningbier og villbier. Dette er svært alvorlig og bekymringsfullt. Det er flere teorier om hva biedøden skyldes, men det er sannsynligvis en kombinasjon av flere årsaker, og insektmidler av typen neonikotinoide kan være en del av forklaringen. De siste årene er det publisert mange studier som viser at neonikotinoide kan ha negativ effekt på honningbier (Chauzat et al., 2011, Blackquiére et al., 2012, Krupke et al., 2012) og humler (Laycock et al., 2012). På oppdrag fra EU Kommisjonen gjorde EFSA en grundig vurdering av risikoen for bier ved eksponering av bl.a. imidakloprid som er et av de mest brukt neonikotinoide plantevernmidlene i verden. EFSA fokuserte på bruken av beisemiddel i sin vurdering og konkluderte med uakseptabel risiko (EFSA 2013 a,b,c). På bakgrunn av EFSA's vurdering trakk EU Kommisjonen tilbake godkjenningen av tre giftigste neonikotinoidene på alle kulturer som er attraktive for bier. Forbudet gjelder i en periode på 2 år i påvente av ny kunnskap. Basert på en samlet vurdering trakk Mattilsynet 15.03.2013 tilbake tillatelsen til bruk av beisemidlet Chinook, som inneholder imidakloprid og som var godkjent i oljevekster.

I fjor gjennomførte Bioforsk på oppdrag fra Mattilsynet en «early warning»-studie hvor imidakloprid-beiset rapsfrø ble dyrket i veksthus. Nektar og pollen ble samlet og analysert for imidakloprid. Imidakloprid ble påvist i konsentrasjoner over deteksjonsgrensen i 5 av 6 nektarprøver ($<LOD-3,1$ ng/g) og 4 av 4 pollenprøver ($1,8-2,8$ ng/g). Selv om det var et lite antall prøver, viste studien at imidakloprid kan finnes i lave konsentrasjoner i nektar og pollen fra beiset frø. Konsentrasjonene var i samme størrelsesorden som andre studier i nektar og pollen av raps rapportert av EFSA (EFSA, 2012).

Bioforsk har i forbindelse med kartlegging av plantevernmidler i avrenning fra og i planteavfall knyttet til veksthusproduksjon, funnet imidakloprid i nesten alle prøver (Roseth 2010, 2012, 2013). Nivåene som er målt i avfallskompost er $0,13-0,17$ µg/g våtvekt (3 analyser, rapport 2010), $0,11$ µg/g våtvekt (1 analyse rapport 2012) og $2,5$ µg/g våtvekt (1 prøve Roseth, pers. med. 2013). Den høyeste målte konsentrasjon av imidakloprid i prøven omregnet til tørrvekt 7 µg/g TS.

Det er kjent at nedbrytning av imidakloprid under aerobe forhold skjer langsomt. I faktaark fra Beyond Pesticides er halveringstid i jord gitt som 27-229 dager med referanse til Fossen, 2006. Fossen oppgir anaerob halveringstid i vann til 26,1 dager (antageligvis samme som referert til i faktaarket), mens aerob halveringstid i jord til 997 dager. Andre halveringstider i jord er 188, 248, 341 og 660 dager i 4 ulike jordtyper som er publisert av amerikansk miljøforvaltning (US Environmental Protection Agency, USEPA, 2008). I samme rapport er 520 dager oppgitt som in-put parameter for halveringstid i modellering for akvatisk eksponering. Ofte er ikke forsøkstemperatur oppgitt og en kan da anta de er gjennomført ved romtemperatur. Med lang halveringstid i laboratorieforsøk forventer en langt høyere halveringstider ute i felt, spesielt i nordisk klima. Det er derfor ikke uventet at man kan gjenfinne imidakloprid i planteavfall eller kompost av planteavfall.

Sett i lys av funn av imidakloprid i 4 av de 5 prøvene av deponert planteavfall og i alle avrenningsprøver fra deponert avfall (opptil 48 µg/l, Roseth, 2012) er denne type planteavfall og kompost en mulig kilde for å overføre imidakloprid til nektar og pollen i trekkplanter og dermed også en mulig fare for eksponering av bier og andre pollinerende insekter.

Plante- og vekstmedieavfall blir ofte deponert i hauger/ranker på området. Blant annet på grunn av fare for smittepress blir ikke komposten brukt i planteproduksjon av næringen, men avhendet på ulike måter.

Bringebær er en god trekkplante og villbringebær er en art som etablerer seg - invaderer - raskt i områder som ligger brakk. Solsikker, en annen god trekkplante og interessant fordi den generelt har blitt mer vanlig å dyrke. Med tanke på gjenbruk av kompost for eksempel som plantemateriale i bed og kjøkkenhager er solsikke også inkludert i undersøkelsen.

Formålet med prosjektet er å undersøke om imidakloprid i kompost fra planteproduksjon i veksthus kan tas opp og translokteres til nektar og pollen i trekkplantene bringebær og solsikke i konsentrasjoner som kan medfører uheldig eksponering av pollinerende insekter.

3. Metodikk

Bringebær og solsikker ble dyrket i veksttorv (Swedish Sphagnum White Peat', Humus-Börsen AB, Sverige) med og uten imidakloprid i vekstrenner. Vekstforsøket er gjennomført i veksthus i perioden mai-september 2013. Nektar og pollen ble innsamlet og analysert for imidakloprid.

3.1 Vekstforsøk

Forsøksoppsett

En oversikt over forsøksoppsett er vist i figur 1. Forsøket har to faktorer, hver med to nivåer, 1) plantesort; bringebær og solsikker og 2) imidakloprid; tilsatt og ikke tilsatt (kontroll-ledd).

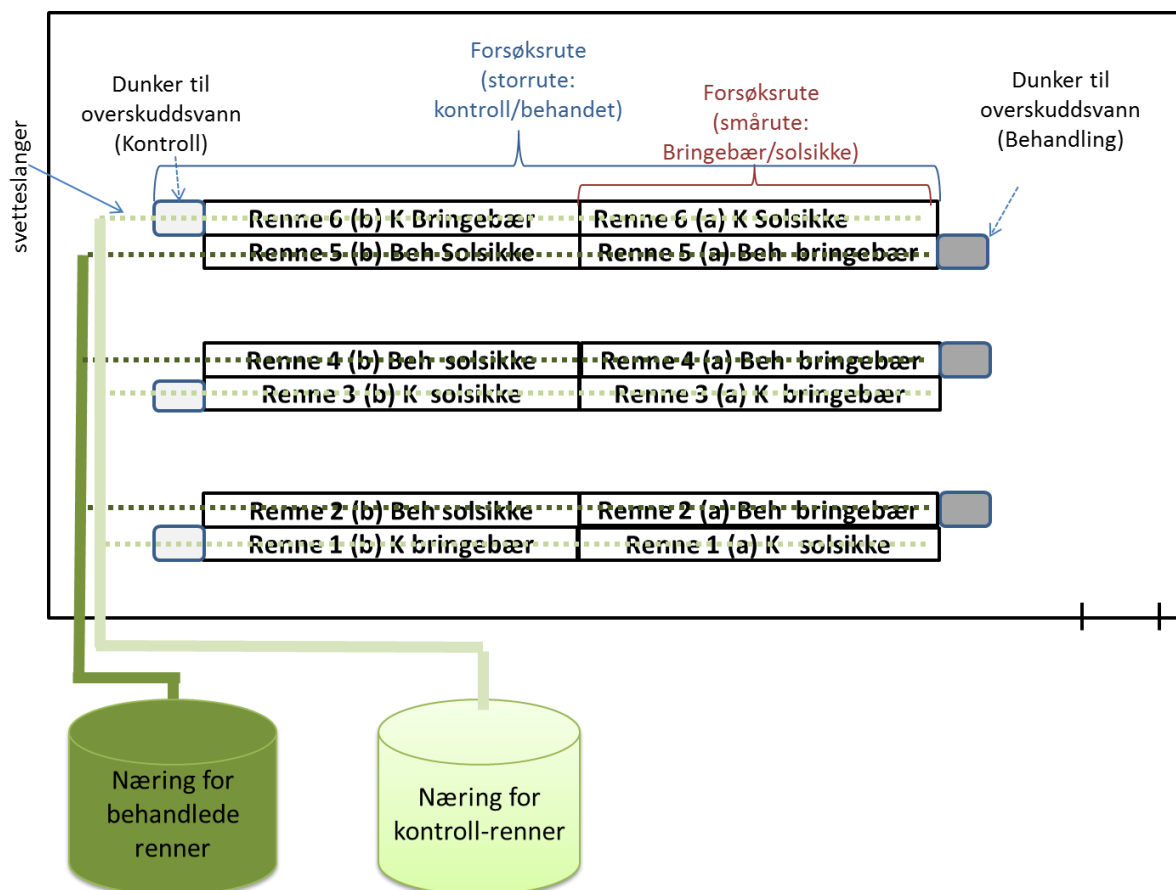


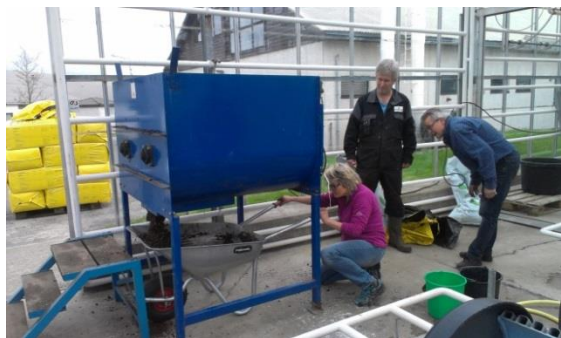
Fig. 1. Forsøksoppsett av vekstrenner og vanningsopplegg.

Etablering av vekstrenner

I vekstrennene ble det lagt drensrør, lecakuler (12 L lecakuler per m), en vekstduk (for å skille mellom lecakuler og jord) og deretter veksttorv. En ende av rennene ble løftet opp ca 12 cm for å gi en svak helling av rennen (ca 2%) og en dunk ble satt i den laveste enden for oppsamling av eventuell overskuddsvann. For å hindre kontaminering mellom kontroll- og imidakloprid-behandlede renner via næringsløsning, var det to separate næringsløsningstanker for kontroll- og behandlede renner. Det ble brukt svetteslange for tilførsel av næringsløsningen (ledetall 2,0). Bruk av svetteslanger reduserer risikoen for krysskontaminering via sprut ved vanning. Hellingen på kontroll- og behandlede renner var hver sin vei for å hindre krysskontaminering i tilfelle mye avrenning til dunkene (se fig.1).

I veksthusproduksjon er en blanding av kalket og gjødslet veksttorv og perlitt vanlig brukt vekstmedie (ca 18% volum perlitt). Dette ble også valgt her. Veksttorv og perlitt og vann (oppvanning av torven) ble blandet i 400 L jordblander. Hver renne ble tilsatt totalt 706 L jordblanding; 600 L veksttorv og 106 L perlitt. Imidakloprid ble tilført vekstmediet i to omganger; en gang etter at ca 350 L vekstmedie var fylt i rennen (halvparten av total mengde vekstmedie) og en gang etter de siste 350 L vekstmedie var lagt i rennen. Handelspreparatet Confidor med aktiv substans imidakloprid (700 g imidakloprid /kg preparat) ble løst i vann (0,69 g imidakloprid i 5 L vann) og hver gang ble imidakloprid sprøytet jevnt utover vekstmediet (hele rennen); 2,5 L per forsøksrute (totalt 1,38 g imidakloprid per renne). Etter siste tilførsel med imidakloprid ble øverste jordlag blandet lett for hånd for å hindre rask fotolytisk nedbrytning av imidakloprid i topplaget.

Netting for å avskjerme flyvende insekt ble hengt opp.



Tillaging av vekstmedie



Fylling av vekstmedie i renner



Sprøyting av imidakloprid



Planting av planter er gjort, 16.05.2013.



Bringebær og solsikke 'Sunsation' i blomstring i juli og solsikke 'Taiyo' i september

Forsøksplanter

Bringebærplanter fra Grimstad planteskole (*Rubus idaeus* 'Glen Ample') sto kjølig et par uker før de ble plassert i veksthus for akklimatisering en uke før omplantet i ferdig preparerte vekstrenner; plantetetthet 12 planter per 3 meter. Sorten 'Glen Ample' er en av den mest vanlige på friland. Plantene ble plantet 15.-16. mai.

Ubeiset solsikkefrø (*Helianthus annuus* 'Sunsation') (kortstilket sort) ble sådd i veksttorv i små potter (diameter 12 cm) (slutten av april), dyrket til omtrent 10 cm lengde før omplantet i vekstmediet i rennene; plantetetthet 18 planter per 3 meter. Solsikkeplantene ble også plantet 15.-16. mai.

Bringebær og solsikker 'Sunsation' ble dyrket fram uten kunstig belysning.

Fordi solsikken 'Sunsation' var pollenfri ble en langstilket sort med mye pollenproduksjon anskaffet. Ubeiset solsikkefrø ((*Helianthus annuus* 'Taiyo')) (langstilket sort) ble sådd i uke 27, første fase dyrket i klimarom, før omplantet i vekstrenner i uke 29. På grunn av sen start av vekstforsøk ble temperaturregulering brukt; dag 22°C og natt 20°C. For å sikre tilstrekkelig lys for å oppnå blomstring av solsikkene ble det gitt kunstig belysning med bruk av 400 W SON-T lampe fra uke 32.

Fra uke 32 var det problemer med maur i bringebær og solsikkene 'Sunsation'. Behandling med insektmiddel var ikke ønskelig, og det ble derfor valgt å behandle med en blanding av melis, bakepulver og siktet hvetemel som ble lagt ut som en felle for mauren. Det ble også smurt grease på gulvet samt langs stolper på vekstrennene for å hindre mauren å klatre opp i vekstrennen.

I løpet av vekstperioden fikk kontroll (ikke behandlet) solsikker 'Taiyo' lus, trips og spinnmidd. Rovmidd, *Phytoseiulus persimilis*, ble tilført en gang (uke 33). Da det ikke var tilstrekkelig ble alle planter, både kontroll og behandlet, sprøytet med en såpeblanding (uke 37). Mot soppangrep ble plantene vannet med Previcur N (propamokarb) (15 ml/10 liter vann/renne) i uke 33.

Prøvetaking av vekstmedie

Prøver fra vekstmedie ble tatt umiddelbart etter sprøyting av imidakloprid (16. mai), i perioden med innsamling av nektar fra bringebær og solsikke 'Suntation' og pollen fra

bringebær (05 juli) og i perioden med innsamling av pollen fra solsikke 'Taiyo' (25 september).

En vekstmedieprøve besto av flere (omtrent 12-14) stikkprøver tatt spredt over en forsøksrute (3 m renne) - det vil si 2 blandprøver per renne - som ble tørket ved 35°C og knust (2 mm) i en møller (Laboratory Cutting Mill SM 200) før prøven ble oppbevart på glass ved -18°C inntil analysering.

Stikkprøvene tatt den 16.mai ble tatt i ulike sjikt. Analysene viste stor spredning og stikkprøvene ved videre prøvetaking ble alle stikkprøver forsøkt tatt i midtre jordlag. Ved prøvetaking den 16.mai ble det tatt prøver av både kontroll og imidaklopid-behandlet renner, mens det den 05. juli og 25. september ble tatt prøver kun av behandlede renner.

En prøve ble analysert per blandprøve fra prøvetaking den 16.mai, mens 3 prøver ble analysert fra hver blandprøve fra prøvetakingen den 05.juli og 25.september.

3.2 Innsamling av nektar og pollen

Bringebær:

Bringebærene startet blomstring første del av juni. Utprøving av metodikk for høsting av nektar startet umiddelbart. Det var lite pollen per blomst samt pollen ble fort klissete av nektar i samme blomst ved høsting. Det ble derfor samlet bare en prøve per forsøksrute istedenfor for minimum to. Innsamling av nektar ble prioritert, og det ble tatt tre prøver per forsøksrute i tillegg til en rekke ekstra nektarprøver i løpet av uke 24-27 (reserveprøver ble behandlet som andre prøver og oppbevart ved -18°C). Bringebærpollen ble samlet i uke 26-27.

Solsikker:

Blomstring av solsikke 'Sunsation' startet senere enn for bringebær, og innsamling av nektar foregikk i uke 26-28. Denne sorten var pollenfri.

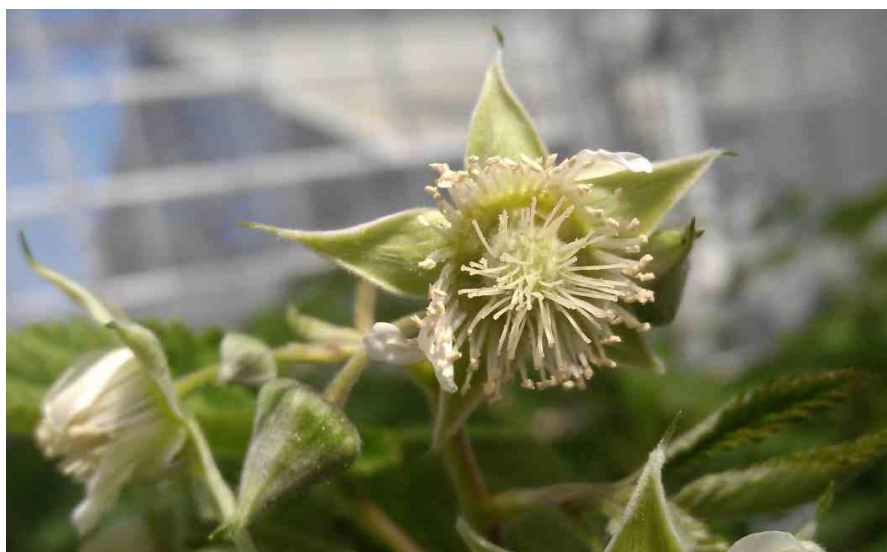
Pollen ble høstet av solsikke 'Taiyo' i uke 38-39.

Innsamlingsmetodikk:

Nektar fra bringebær ble samlet med kapillærrør (50 µl), mens nektar fra solsikker ble samlet med tynnere kapillærrør (5 og 10 µl). Prøver ble ført over i ekstraksjonsrør (10 ml) og veid. Det var ønske om prøvemengde > 100 mg. Prøver med mindre prøvemengde enn 100 mg ble satt kjølig (4°C) inntil nok prøvemateriale var samlet, og deretter lagret ved -18°C inntil analysering. Mengde nektar i bringebærblomster var generelt mye høyere enn i solsikker, men for begge artene varierte nektarinholdet betydelig avhengig av værforhold og vannfuktighet i jord. Det var mange dager hvor det var for liten produksjon til nektarinnsamling. For å stimulere transpirasjon og produksjon av nektar i solsikker på dager med lav produksjon, ble plastposer tredd over plantene noen timer før nektarsamling.

For å redusere muligheten for krysskontaminering mellom prøver fra kontroll og behandlede renner ble hendene vasket mellom pollenprøvetaking av bringebær og det ble brukt separate plastposer til kontroll- og behandlede planter osv.

For å høste pollen fra bringebær ble pollen gnidd av pollenknappen med fingrene. Solsikkene ‘Taiyo’ hadde mye pollen og det var nok å rist i planten/blomsten og samle pollen på et ark og siktet gjennom en sikt før overført til prøverør.



Nektar fra bringebær og pollen fra solsikke ‘Taiyo’

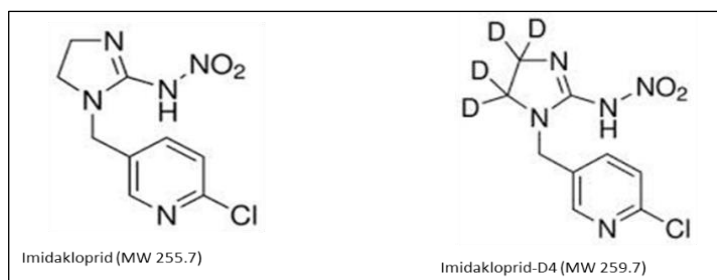
3.3 Analyser

Modifisering og nedskalering av QuEChERS

QuEChERS er en forkortelse for “Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe”, som har blitt den mest brukte ekstraksjonsmetoden blant laboratorier som analyserer for pesticider (Anastassiades et al., 2003). Bioforsk sin akkrediterte multimetode på LC-MS/MS (M86),

som også dekker imidakloprid, benytter QuEChERS som metode for prøveopparbeidelse. For å kunne analysere prøvemengde på 0,05 - 0,1 gram, mot normalt 10 gram, ble metoden nedskalert.

Det ble ikke benyttet opprensning med dispersivt fastfase materiale (dSPE), og prøveekstraktet oppkonsentreres til et sluttvolum på 0,2 ml etter ekstraksjon, og analyseres på LC-MS/MS.



Figur 2. Kjemisk struktur av imidakloprid og imidakloprid-D4.

Imidakloprid-D4 tilsettes prøvene før ekstraksjonsprosessen. Deuterium (D) er vist i strukturen og erstatter plassen til hydrogen i imidakloprid.

3.3.1 Ekstraksjon

Prøvene ble tilsatt isotopmerket imidakloprid (imidakloprid D4, figur 2) som internstandard før ekstraksjon for å korrigere for feilkilder slik at analyseresultatene blir riktig.

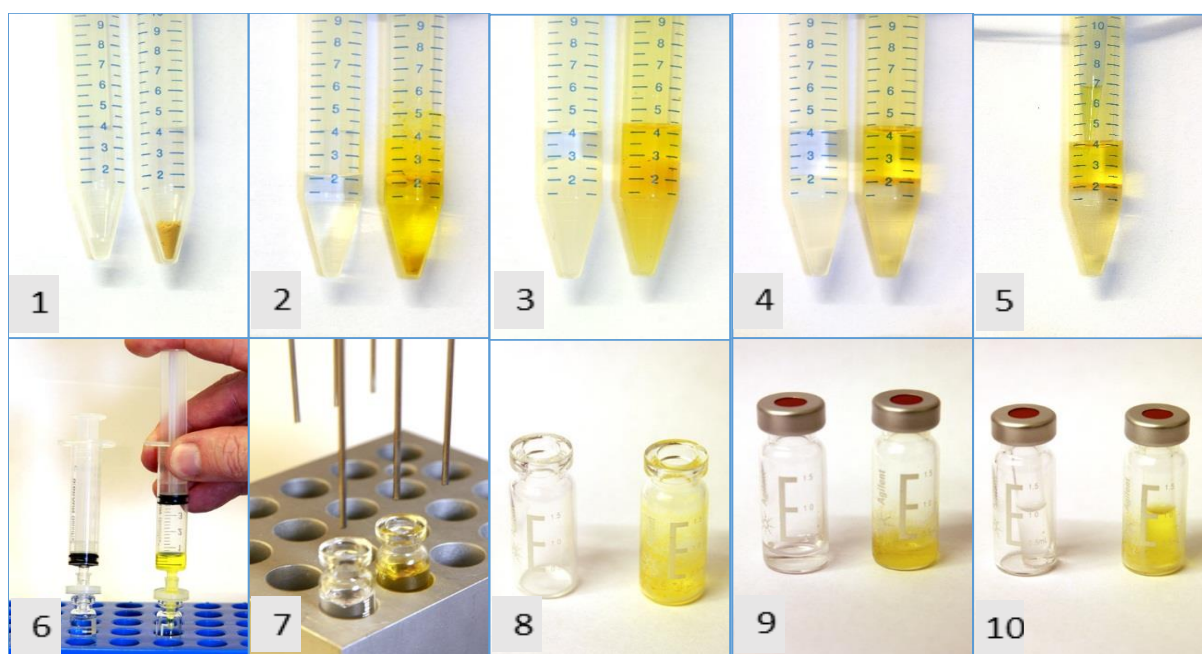
Imidakloprid-D4 er isotopmerket imidakloprid med fire deuterium-atomer og som gir en økning i molekylvekten på fire. Dette benyttes for å korrigere for variasjoner i de små volumene som benyttes i prøveekstraksjonen og oppkonsentreringen. Imidakloprid-D4 har de samme kjemiske egenskapene som imidakloprid bortsett fra molekylvekten. Dette gjør det mulig å måle denne på massespektrometeret (MS/MS) uten interferens fra vanlig imidakloprid i prøver og standarder. Imidakloprid-D4 korrigerer for variasjoner i volum og tap av prøve under opparbeidelse og analyse. Det benyttes samme metode for både nektar og pollen.

Ekstraksjon ble utført i 10,0 ml ekstraksjonsrør av plast. Prøvene tempereres til romtemperatur (unngå eksponering for direkte lys) før prøveopparbeidelse. Det veies inn 50,0 - 150,0 mg prøve direkte i ekstraksjonsrøret. Det benyttes pipette med plast-tip til nektar og pipetter ca. 70 µl over i ekstraksjonsrør. Til pollen benyttes det liten spatel til uttak og innveiing av prøve.

Prosedyren er som følger:

1. Prøven tilsettes 50 µL internstandard (imidakloprid-D4, 0,04 µg/ml i acetonitril)
2. Det tilsettes 2,0 mL acetonitril til ekstraksjonsrøret. Det skal ikke være klumper av pollen under ekstraksjon. Disse brytes opp ved å dunke ekstraksjonsrøret til pollenet er disperst.
3. Skru på kork og ristes med vortex i ≥ 10 sekunder.
4. Ekstraksjonsrøret åpnes og 2,0 mL mettet citratløsning (Supelco 55227-U løst i Milli-Q vann) tilsettes.

5. Ekstraksjonsrøret med ekstraktene settes på «end-over-end» i 10 minutter med hastighet 6.
6. Ekstraktene sentrifugeres med hastighet 3000 r.p.m. i 5 minutter.
7. Åpne ekstraksjonsrøret forsiktig uten å riste opp faseskillet.
8. Med pipette forsiktig suge av ($2 \times 0,85$ ml) øverste fase (acetonitril) fra prøven uten å få med nederste fase.
9. Overfør ekstraktet av øverste fase i sprøyte med påmontert filter ($0,2 \mu\text{m}$), og filtrer ekstraktet over i et 2,0 mL prøveglass.
10. Prøveglasset med filtrert ekstrakt settes på varmeblokk 50°C og dampes inn til tørrhet under nitrogen tilførsel (ca. 35 min.).
11. Prøven løses i $200 \mu\text{L}$ acetonitril, og ristes på vortex i 10 sekunder med lokk (cap).
12. Dette gir en prøvekonsentrasjon på $0,25 - 0,75 \text{ g/mL}$.
13. Prøven overføres på insert i prøveglasset med lokk (cap).
14. Prøvene analyseres på LC-MS/MS samme dag eller lagres i fryser frem til analyse



1. Innveid 73 mg prøve av nektar (venstre) og pollen (høyre). 2. Prøver tilsatt 2,00 ml acetonitril.
3. Prøver tilsatt 2,00 ml mettet citratløsning. 4. Prøve etter ekstraksjon og sentrifugering.
5. Utpipettering av 1,7 mL ekstrakt (øverste fase). 6. Filtrering av prøveekstrakt over i 2,0 mL prøveglass.
7. Inndamping av prøveekstrakt på varmeblokk og nitrogen gass tilførsel.
8. Prøve av nektar og pollen etter inndamping til tørrhet. 9. Prøve oppkonsentrert til $200 \mu\text{L}$ ml i acetonitril. 10. Prøve overført på insert i prøveglass for LC-MS/MS analyse.

Figur 3. Prøveopparbeidelse av nektar og pollen

Reagensblank prøve:

En reagensblankprøve er en prøveopparbeidelse uten prøvemateriale for å kontrollere om kjemiske interferenser og forurensninger kan komme fra andre kilder enn prøvematerialet. Dette gjøres for å kontrollere metoden for falske positive resultater. Til reagensblank benyttes de samme kjemikaliene og utstyr som benyttes i prøveopparbeidelsen.

Ved hver analyse opparbeides og analyseres det tre eller flere reagensblanker.

På instrumentet injiseres det også rent løsningsmiddel (acetonitril) fra prøveglass for å kontrollere for krysskontaminering mellom injeksjonene av prøver og standarder, og kontrollerer kjemiske interferenser kun fra instrumentet.

Kontrollprøve:

Det ble laget en sukroseløsning i Milli-Q vann (25 % w/w). Nektar består hovedsakelig av vann og sukker, og sukrose er den sukkerarten som det er mest av i nektar.

Til denne løsningen ble det tilsatt imidakloprid tilsvarende 10,0 ng/g. Kontrollprøven ble veid inn til 50 - 60 mg fordelt i ekstraksjonsrør. Vekten på prøven ble registrert og prøvene settes i fryser sammen med prøver til analyse. Til hver prøveserie som ble opparbeidet, ble det analyser en eller flere kontrollprøver. Kontrollprøvene ble benyttet for å se på hvor stabilt imidakloprid er over flere dager og under prøveopparbeidelsen.

Det ble ikke laget kontrollprøve som tilsvarer pollen fordi det er forventet at imidakloprid i pollen er mer stabilt da det er mindre vann tilgjengelig.

3.3.2 Instrument analyse (LC-MS/MS)

Imidakloprid analyseres i positiv mode på Agilent 1200 væskechromatograf med Agilent 6410B MS/MS-detektor med API-ES og MassHunter software. Etter analyse beregnes prøvene i "Agilent MassHunter Quantitative Analysis" programvaren.

Betingelser:

Kolonne: Zorbax Eclipse Plus C18, 100 mm × 2,1 mm i.d. Partikkelstr: 1,8 µm

Mobilfase: A: Milli-Q vann med 5 mM NH₄HCOO + 0,01 % maursyre B: Metanol med 5 mM NH₄HCOO + 0,01 % maursyre

Gradient: 80 % A ved start, deretter til 0 % A ved 5 min., hold i 7 min., deretter til 80 % A ved 15.1 min og hold i 5 min. (Totalt 20 min.)

Flow: 0,30 mL/min.

Kolonnetemperatur: 50 °C

Injeksjon: 4 µL injeksjon, med nålvask etter injeksjon.

Temperatur autosampler: 4 °C

MS-detektor: Deteksjon: MS/MS i MRM-mode

Ionisering: ESI

Polaritet: Positiv

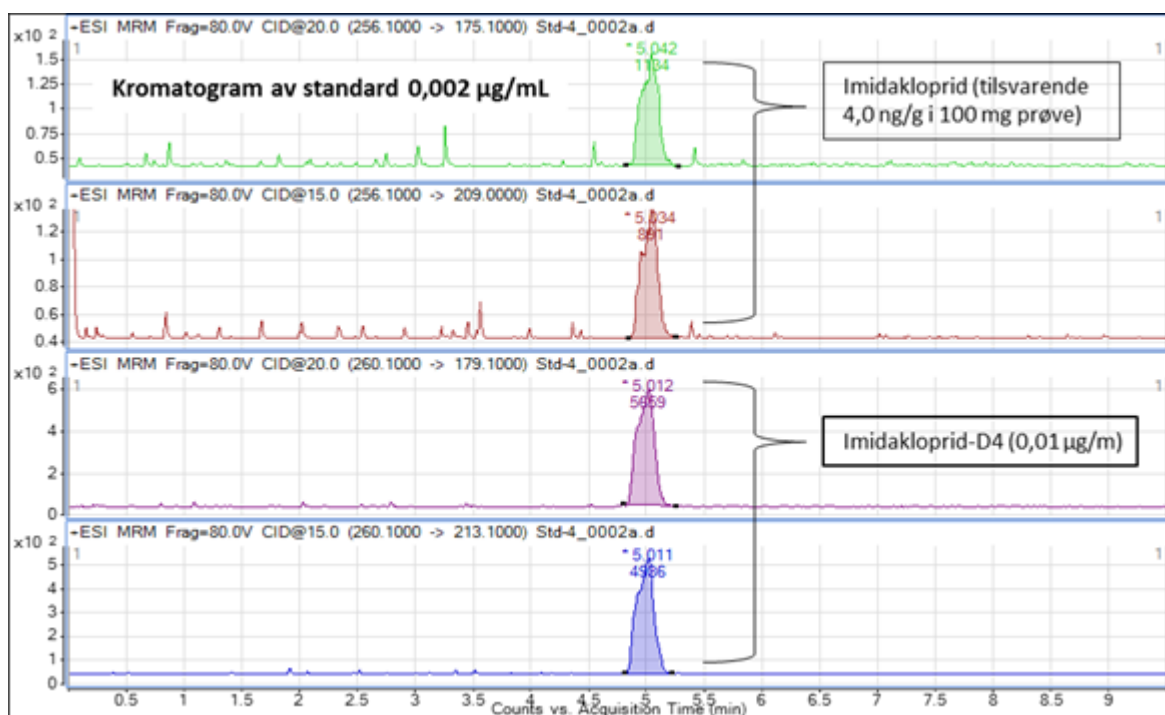
Tabell 1: Parametere for MS/MS instrumentet.

			Kvantifiserings-overgang (MRM1)				Bekreftelses-overgang (MRM2)			
Stoff	Rt (min.)	Fragmentor (V)	Pre. lon (m/z)		Prod. lon (m/z)	CE (eV)	Pre. lon (m/z)		Prod. lon (m/z)	CE (eV)
Imidakloprid	5,0	80	256,1	→	175,1	20	256,1	→	209,0	15
Imidakloprid-D4	5,0	80	260,1	→	179,1	20	260,1	→	213,1	15

På instrumentet benyttes det væskechromatografi (LC) for separasjon av stoffene i prøven. Stoffene injiseres i en væskestrøm og separeres ved at denne går gjennom en kolonne. Væskestrømmen med stoffene overføres til spraykammeret på MS/MS-instrumentet for

ionisering og separasjon fra væsken. Ved høyt vakuum overføres de ioniserte stoffene til massefiltrene (kvadrupoler) i massespektrometret (MS). I instrumentmetoden settes det opp hvilke ioner som skal slippe gjennom massefiltrene og treffe detektoren slik at disse kan måles.

LC-MS/MS instrumentet er svært følsomt og spesifikt. For å unngå kryss kontaminering mellom prøver og standarder gjøres det ekstra injektorvask i instrumentprogrammet mellom prøvene, og det benyttes kun standarder på konsentrasjon 20 ng/ml eller lavere. Prøvene analyseres på LC-MS/MS sammen med standarder som har kjente konsentrasjoner for å bestemme innholdet i prøvene. Det gjøres også analyse av prøver tilsatt kjent mengde (kontrollprøve tilsatt 10,0 ng/g) for å kontrollere gjenfinningen med prøveopparbeidelsen og analysen på instrumentet.



Figur 4. Kromatogram fra analyse av standard med imidakloprid (0,002 µg/ml) og imidakloprid-D4 (0,01 µg/mL). Begge stoffene måles med to ione-overganger (MRM) hver. Arealet av ione-overgangen 256.1 → 175.1 m/z (MRM1) benyttes til kvantifisering. Ratio mellom av ione-overgangene 256.1 → 175.1 m/z (MRM1) og 256.1 → 209.0 m/z (MRM2), samt retensjonstid (5.0 min.) benyttes til å bekrefte tilstedeværelse vs. av imidakloprid.

3.3.3 Validering / kvalitetssikring av metode

Validering av metoden gjøres for å teste og dokumentere metoden som benyttes til de kvantitative målingene for imidakloprid i nektar og pollen.

Valideringen av metoden ble gjort i henhold til dokument SANCO (2011): “Method Validation & Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food & Feed Document N° SANCO/12495/2011”.

Det ble laget en valideringsplan for metoden med fem tilsetninger av imidaklopid i nektar (bringebær) og pollen (solsikke) på to ulike nivåer. Valideringen for nektar ble analysert sammen med nektar prøvene, og tilsvarende ble gjort for pollen prøvene.

Beregning og bearbeidelse av prøver og validering ble gjort med samme kvantifisering.

Opparbeidelse av tilsetningsprøver ble startet en time etter at imidaklopid ble tilsatt prøvene.

3.4 Statistikk

Dataene brukt i den statistiske analysen stammer fra et split-plot forsøk i tre blokker og de ble modellert og analysert ved hjelp av en lineær, blandet statistisk modell med de to faste faktorene plantesort, med de to nivåene bringebær og solsikke, og imidaklopid, med de to nivåene tilsatt imidaklopid og ikke-tilsatt imidaklopid (kontroll), og med blokk som tilfeldig faktor, med tre nivåer. For hver forsøksrute ble gjennomsnittet av de observerte imidaklopid konsentrasjonene beregnet, og det var disse gjennomsnittsverdiene som inngikk i de statistiske modellene som ble brukt. På den måten baseres på en måte den statistiske modelleringen på 12 observasjoner, en fra hver forsøksrute. I modellene ble både de faktisk observerte imidaklopid konsentrasjonene og en logaritmetransformert konsentrasjon brukt som responsvariabel. Hovedresultatene fra de statistiske dataanalysene viser samme tendens om vi bruker imidaklopid konsentrasjonen direkte som responsvariabel eller om vi bruker en logaritmetransformert imidaklopid konsentrasjon som responsvariabel. Spesielt for nektar synes den logaritme transformerte imidaklopid konsentrasjonen å ha en fordeling som er nærmere en normalfordeling enn den utransformerte imidaklopid konsentrasjonen. Beregningene ble utført ved hjelp av proc mixed, Sas versjon 9.2.

4. Resultat og diskusjon

4.1 Vekstmedie

De fleste opptaksforsøk er utført i vannkulturer eller i godt homogenisert jord i små pletter. I vårt forsøk med innhøsting av nektar og pollen var det nødvendig å fravike dette prinsippet for å sikre tilstrekkelig prøvemateriale.

Imidakloprid ble sprøytet over jorden i to lag (midt i og på toppen) etter vekstmedie var lagt i renne og ikke blandet inn og homogenisert i vekstmedie før det ble overført vekstrenner. Denne metoden sikrer nøyaktig lik mengde imidakloprid per forsøksrute og det var også omtrent sammen mengde veksttorv tilsatt hver renne. Teoretisk estimert konsentrasjon i vekstmediet var 28 µg/g TS.

Det var stor konsentrasjonsvariasjon i de analyserte vekstprøvene. Gjennomsnittlig og minimum-maksimum konsentrasjoner for behandlede renner er vist i tabell 2. Gjennomsnittlig imidakloprid per forsøksruter (små rute) prøvetatt juli og september viste også stor variasjon (ikke vist).

Imidakloprid-konsentrasjonen i prøver tatt 16. mai (n = 7) og hvor stikkprøvene bevisst var tatt fra ulike sjikt i vekstmedie, varierte mellom 10,4 - 108,2 mg/kg TS - en faktor på 10 (tabell 2). Ved videre prøvetaking ble stikkprøver tatt fra midtre vekstlag og variasjonen ble litt mindre. Gjennomsnittskonsentrasjonen i prøvene i juli (n = 18) og september (n = 18) viste henholdsvis 40,8 µg/g TS (25 % standardavvik) og 33,3 ± 10,1 µg/g TS (30 % standardavvik). Til tross for mindre variasjon i prøvene tatt i juli og september er det ikke usannsynlig at stikkprøvene fra i midtre lag hadde en høyere konsentrasjon enn den reelle gjennomsnittlige konsentrasjon i hele vekstmedie, og som røttene ble eksponert for.

Imidakloprid er en relativt mobil forbindelse med en jordadsorpsjon-koeffisient K_d 0,956-4,18 og K_d korrigert for organisk innhold er K_{oc} 132-310 (Fossen 2006). pKa-veriden for amino-gruppen i imidakloprid er 11,12 og imidakloprid vil foreligge som kation i vekstmediet. Adsorpsjon, binding, til jord varierer med jordtype og innhold av leire og organisk materiale; økt binding med økt organisk materiale (Cox et al. 1998a,b). Vi har brukt veksttorv i denne studien, som er mest realistisk i forhold til avfall fra gartnerier, samt at vanning har vært regulert for å unngå avrenning fra rennene.

En kan anta at de to imidakloprid-lagene i løpet av forsøket til en viss grad ble mer fordelt nedover i vekstmedie, men ikke tilstrekkelig til å forvente homogen konsentrasjon nedover massen.

Metodikken vi har brukt (lik mengde imidakloprid per renne jevnt fordelt over lik mengde vekstmedie) tilsier at teoretisk konsentrasjon, 28 µg/g TS, er en mer reell konsentrasjon i hele vekstmediet enn hva prøveanalysene viser.

Vekstmedie i kontrollrennene ble analysert ved oppstart (16. mai) og inneholdt ikke imidakloprid. Prøver fra kontrollrennene ble derfor ikke analysert videre.

Tabell 2: Imidakloprid-konsentrasjoner, gitt i $\mu\text{g/g TS}$, i behandlet vekstmedie. Prøver er tatt ved oppstart (16.mai), i perioden med høsting av nektar og bringebærpollen (05.juli) og høsting av solsikkepollen (25.september). Gjennomsnitt av alle behandlede renner er $n = 18$. Ingen funn i kontrollrenner. Teoretisk beregnet imidakloprid-konsentrasjon var $28 \mu\text{g/g TS}$.

	Imidakloprid-konsentrasjon ($\mu\text{g/g TS}$)		
	16.mai	05.jul	25.sep
Min. - Maks.	10,4-108,2	26,5-67,5	22,8-59,1
Gjennomsnitt \pm std	$40 \pm 32,5$	$40,8 \pm 10,2$	$33,3 \pm 10,1$

Første runde med høsting (nektar og bringebærpollen) var omtrent 60 dager etter sprøyting og andre runde (solsikkepollen) etter 120 dager. Det var litt lavere minimum og maksimum konsentrasjoner av imidakloprid i juli og september samt også lavere gjennomsnittskonsentrasjon (tabell 2). Vi har ikke bestemt halveringstid for imidakloprid under våre forsøksbetingelser, men analysene tyder på at en noe lavere imidakloprid-konsentrasjon i vekstmedie ved høsting av solsikkepollen enn de andre prøvene.

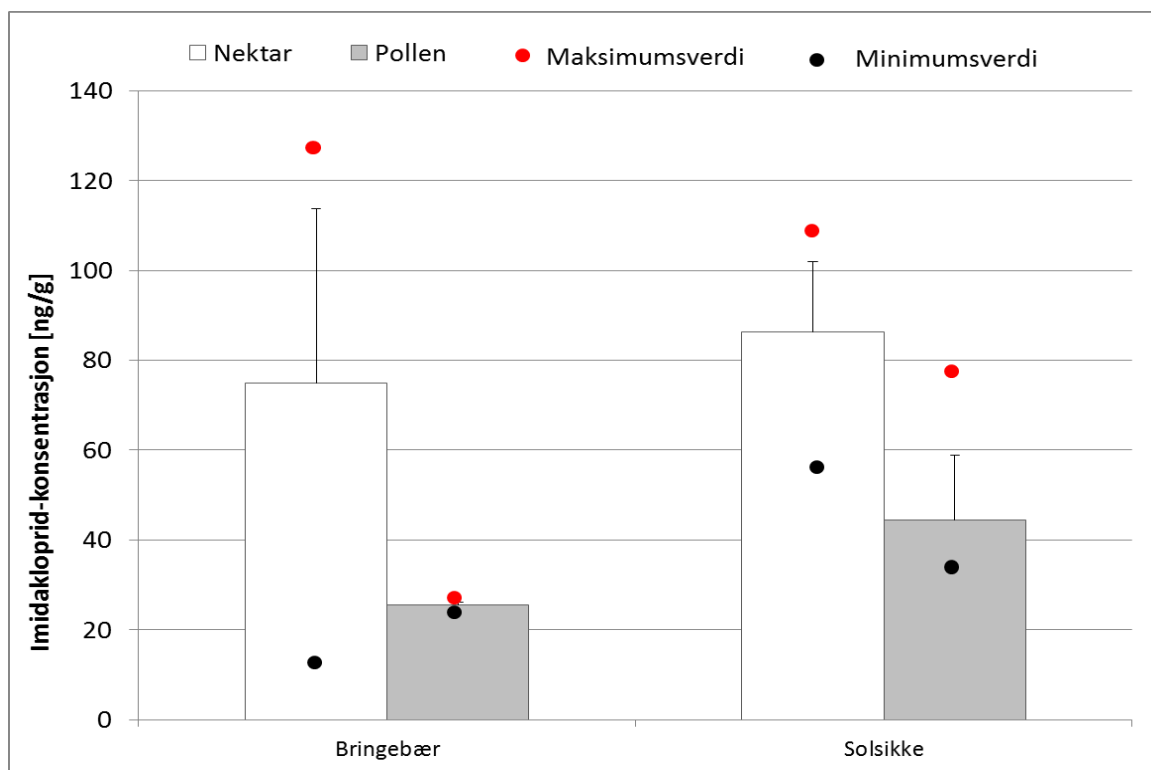
4.2 Nektar- og pollenprøver

Imidakloprid ble funnet over kvantifiseringsgrensen (LOQ) i alle nektar- og pollenprøver fra bringebær og solsikke som vokste i veksttorv tilsatt imidakloprid (teoretisk estimert konsentrasjon $28 \mu\text{g/g TS}$). Imidakloprid-konsentrasjonen i nektarprøver fra bringebær var mellom $16,7$ - $131,8 \text{ ng/g}$ og fra solsikke 'Sunsation' mellom $37,5$ - $109,6 \text{ ng/g}$. I solsikkepollen 'Taiyo' var imidakloprid-konsentrasjonen mellom $28,5$ - $79,3 \text{ ng/g}$. Det var kun tre prøver av behandlet bringebærpollen og konsentrasjonen lå mellom $25,0$ - $26,4 \text{ ng/g}$. Det ble tatt færre prøver av bringebærpollen enn planlagt på grunn av problemer med å samle nok pollen.

Minimum, maksimum og gjennomsnittlig imidakloprid-konsentrasjon i nektar og pollen fra planter dyrket i imidakloprid-behandlede renner er vist i tabell 3 og en grafisk sammenstilling i figur 6.

Tabell 3. Minimums, maksimums og gjennomsnittlig (med standardavvik) imidakloprid-konsentrasjon i nektar og pollen for planter dyrket i behandlede renner ($n = 3$ for bringebærpollen, $n = 9$ for de andre). Konsentrasjon i nektar og pollen er gitt i ng/g .

		Min. - Maks.	Gjennomsnitt \pm standardavvik
Nektar	Bringebær	16,7 - 131,8	$74,8 \pm 38,9$
	Solsikke	59,0 - 109,6	$86,3 \pm 15,7$
Pollen	Bringebær	25,0 - 26,4	$25,5 \pm 0,7$
	Solsikke	28,5 - 79,3	$44,4 \pm 14,3$



Figur 6. Grafisk framstilling av imidakloprid-konsentrasjon i nektar og pollen i bringebær og solsikker dyrket i vekstmedie tilsatt imidakloprid. Gjennomsnittsverdi med standardavvik, minimums- og maksimumsverdier er vist ($n = 3$ bringebærpollen og $n = 9$ for de andre).

Av total 30 prøver fra planter dyrket i veksttorv uten imidakloprid var det tre funn over LOQ (4,3 - 9,0 ng/g), i pollen; to fra bringebær og en fra solsikke. Reanalyser av to av pollenprøvene som det var mer prøvemateriale fra viste også funn over LOQ. Reanalyser av nektarprøver fra samme kontrollrenner viste ingen funn over LOQ. Analyser av jordprøver fra kontrollrenner viste heller ingen funn av imidakloprid. Dette bekrefter vår antagelse om krysskontaminering ved prøvetaking.

Krysskontaminering av imidakloprid i pollenprøver skyldes mest sannsynlig fysisk nærhet mellom kontroll- og behandlede renner. Planter fra behandlede renner kom over i kontrollrenner. Solsikkene 'Taiyo' ble over 2 m høy, og nettingen ble fjernet for å flytte veksthuslampene høyere (uke 32), og det var noen bier som kom inn i veksthuset. De kunne fly mellom behandlede- og kontrollrenner og derfor kunne det teoretisk bli noe krysskontaminering. Vi forsøkte å unngå å høste pollen fra kontrollplanter hvor vi så at solsikker fra behandlet renne var høyere og lå over kontrollplantene, men det kan likevel tenkes at det her har skjedd en krysskontaminering. På grunn av lite pollen på bringebærblomster, og at det var nødvendig å gni pollen av pollenknappene kan det også her ha vært krysskontaminering mellom behandlet og kontrollprøver (til tross for vask av hender mellom kontroll- og behandlede blomster).

4.3 Reagensblank og validering av metodikk

Reagensblank prøve.

Det var ingen påvisning av imidakloprid i alle reagensprøver som ble analysert sammen med prøvene. Injeksjon av rent løsningsmiddel (acetonitril) viste ingen krysskontaminering mellom injeksjonene av prøvene på instrumentet eller interferens fra instrumentet. Det ble også injisert rent løsningsmiddel med imidakloprid-D4, og denne viste heller ingen spor av imidakloprid. Dette sikrer at påvist imidakloprid kun kommer fra prøven.

Kontrollprøve (10 ng/g imidakloprid i sukroseløsning 25 % w/w)

Det ble analysert totalt 11 kontrollprøver, hvor av tre er injiser og analysert to ganger.

Det er 14 enkeltresultater for kontrollprøver. Gjenfinningen er i intervallet 82 - 102 % for alle kontrollprøvene er med relativt standardavvik (RSD) på 6,6 %. Det er ikke tilstrekkelig data over tid til å beregne reproducerbarhet, men RSD < 10 % viser at avviket mellom de to analyseseriene er lavt.

Validering / kvalitetssikring av metode

Data og kromatogram fra validering nr. 2013/14 «Validering av metode for analyse av imidakloprid i nektar og pollen» er vist i vedlegg nr. 8. Resultatene viser at metoden oppfyller kravene som er bestemt i «Document N° SANCO/12495/2011».

Valideringen viser at metoden er godt egnet for analyse av imidakloprid i nektar og pollen med en bestemmelsesgrense (LOQ) på 4,0 ng/g.

Linearitet

Korrelasjonskoeffisient (r) > 0,9993 (> 0,9987 r^2). Maks % residual er 1,7 %. Dette viser svært god linearitet.

Gjenfinning

Nektar:

4,58 - 9,62 ng/g (Level 1): 92 - 108 % (snitt =100 %, N=5).

59,2 - 74,4 ng/g (Level 2): 97 - 104 % (snitt =101 %, N=5)

Pollen:

3,81 - 6,88 ng/g (Level 1): 100 - 124 % (snitt =116 %, N=5).

39,2 - 71,4 ng/g (Level 2): 98 - 108 % (snitt =101 %, N=5)

Alle enkelt-tilsetningene har gjenfinning innenfor 90 - 125 % med snitt innenfor 100 - 116 %. Dette er meget bra. I pollen er det litt interferens som gjør at gjenfinningen er litt høyere (124 %) men dette vurderes ikke som vesentlig.

Repeterbarhet

Repeterbarhet uttrykkes i relativt standardavvik (RSD).

Nektar:

Level 1: RSD = 6,1 % (N=5) Level 2: RSD = 2,9 % (N=5)

Pollen:

Level 1: RSD = 8,4 % (N=5) Level 2: RSD = 3,9 % (N=5)

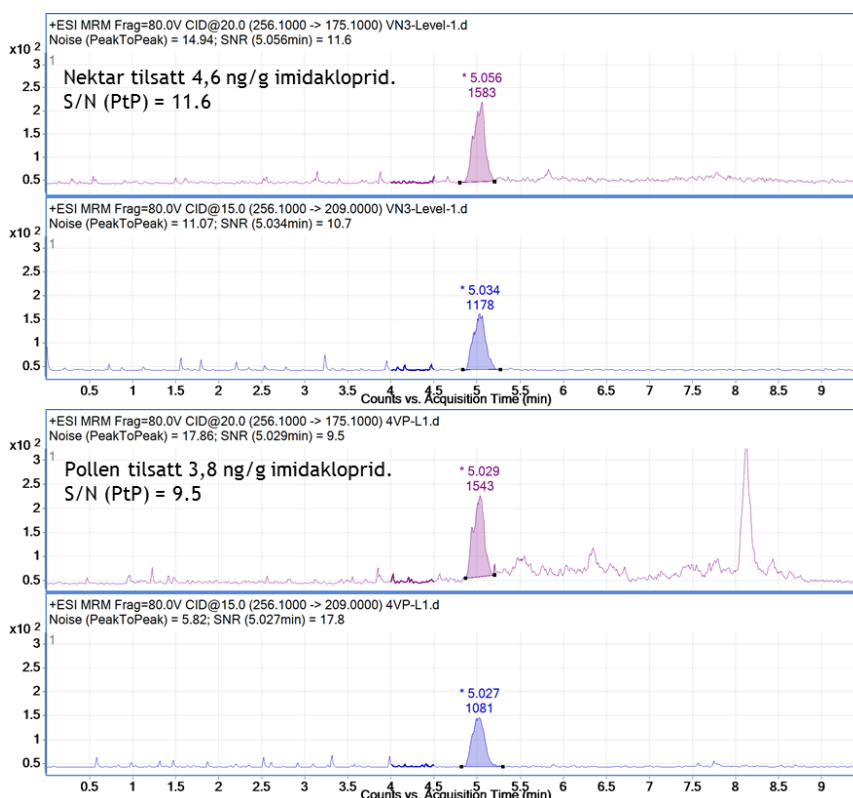
Alle tilsetningene har repeterbarhet (RSD) \leq 8,4 %. Dette er svært bra (krav <20 %).

Matrikseffekt

Ved bruk av isotopmerket internstandard imidaklopid-D4 blir resultatene automatisk korrigert for eventuelle matrikseffekter.

Bestemmelsesgrense

LOQ er satt til 4,0 ng/g for nektar og pollen.



Figur 5. Kromatogrammer av nektar og pollen tilsatt imidaklopid på laveste konsentrasjon. Beregning av S/N ratio på MRM overgang 256,1 \rightarrow 175,1 m/z, som benyttes til kvantifisering. Bestemmelsesgrense er beregnet til 4,0 ng/g hvor S/N = 10.

Sporbarhet

Det ble analysert en standard (Std. M86-4) fra vår akkrediterte metode. Denne har sporbarhet til tidligere ringtester (EUPT-07).

Spesifisitet

Det er ingen interferens > 30 % av LOQ i de testede matriksene.

Stabilitet

Alle standarder lagres i fryser og blir ved hver analyse kontrollert mot standard fra M86 som er akkreditert. Opparbeidelse av kontrollprøver sammen med prøvene viser ingen vesentlig nedbrytning da gjenfinningen er 82 - 102 %.

Vurderinga av analysemetoden

Valideringen viser at metoden er godt egnet for analyse av imidakloprid i nektar og pollen med en bestemmelsesgrense (LOQ) på 4,0 ng/g. Detaljer for tilsetningsforsøkene er vist i vedlegg 7.

Alle funn av imidakloprid oppgitt i rapporten oppfyller kravene beskrevet i Document N° SANCO/12495/2011» side 17 -19 « Confirmation of results». Alle funn i prøver har retensjonstid (Rt) i kromatogrammet som er innenfor $\pm 2,5$ % av imidakloprid-D4 i prøven. På LC-MS/MS bestemmes og måles imidakloprid ved to MRM-overganger, som er 256,1 \rightarrow 175,1 m/z (MRM1) og 256,1 \rightarrow 209,0 m/z (MRM2). Ratioen (forholdstall) mellom MRM1 og MRM2 bestemmes ved arealene til hver av signalene i kromatogrammet. Imidakloprid er bekreftet påvist når ratio for imidakloprid i prøven er innenfor ± 20 % av imidakloprid i en standardløsning.

Krav til nøyaktigheten for kvantifisering av funn er oppfylt og beskrevet i punkt 3.3.3 validering /kvalitetssikring av metoden.

4.4 Vurdering av funn av imidaklorpid

Studien vår viser at planteavfall/kompost fra veksthusaktivitet som inneholder rester av imidakloprid kan tas opp og overføres i nektar og pollen i trekkplanter for bier.

De høyeste imidakloprid-konsentrasjonene i nektar og pollen i denne studien (vokst i 28 $\mu\text{g/g}$ TS) var henholdsvis 131,8 ng/g og 79,3 ng/g. Det foreligger liten kunnskap om konsentrasjonsnivåer av imidakloprid i planteavfall/kompost fra veksthusnæring som anvender imidakloprid. Av per i dag 5 kjente analyser er 7 $\mu\text{g/g}$ TS den høyeste verdien av imidakloprid. Teoretisk konsentrasjon i vår studie, 28 $\mu\text{g/g}$ TS, og omtrent 4 ganger høyere. Hvis vi antar en lineær sammenheng mellom konsentrasjonsnivå i vekstmedie og opptak og translokering til nektar og pollen vil vi, ut fra denne studien, kunne anslå høyeste beregnet konsentrasjon i nektar og pollen i planter som vokser i kompost/planteavfall med 7 $\mu\text{g/g}$ TS ha et forventet innhold på 32,8 ng/g i nektar og 19,8 ng/g i pollen.

Imidakloprid er ekstremt giftig for bier. Akutt LD₅₀ er 115 ng/g mens kronisk NOEC er 24 ng/g (EFSA 2013).

EFSA foreslår å beregne potensialet av kroniske effekter ved å dele rester av imidakloprid som bier kan innta i løpet av et døgn med giftighetsverdien. I EFSA's rapport er det sammenstilt en oversikt hvor mye nektar og pollen som honningbier inntar. Trekkbier inntar ca. 32-128 mg sukker i nektar fra blomster/individ/dag, mens pleiebier inntar ca. 34-50 mg sukker i nektar fra blomster/individ/dag pluss ca. 6,5-12 mg pollen/individ/dag. I følge EFSA (2012) varierer sukkerinnholdet i nektar fra 15-65%.

Siden det kroniske endepunktet (NOEC) for imidakloprid er oppgitt kun som en konsentrasjon (ng/g) istedenfor en daglig inntaksverdi kan man ikke gjøre beregningen EFSA foreslår. Men man kan imidlertid sammenligne nivået av imidakloprid i nektar - henholdsvis 131 og 109 ng/g i bringebær og solsikke med den kroniske giftighetsverdien 24 ng/g for trekkbier som kun inntar nektar. Også den teoretisk antatt høyeste imidakloprid-verdien i nektar 32,8 ng/g er høyere enn kronisk NOEC (24 ng/g). Det må nevnes at denne sammenligningen ikke tar hensyn til det faktiske imidaklopridinntaket hos biene.

I forsøket var bringebær og solsikker valgt som relevante trekkplanter. Villbringebær vil raskt etablere seg i områder hvor kompost/planteavfall blir liggende brakk. Ved bruk av

kompost i ulike bed kan solsikker være en aktuell plante å dyrke. Det er også andre gode trekkplanter som er relevante i forhold til å dyrke i slike bed eller ulike villblomster som vil invaderer vekstavfall som blir liggende brakk.

Det er kjent at ett og samme stoff kan ha ulikt opptak og fordelingsmønster i ulike plantearter (Eggen og Lillo, 2012). I vår studie var det ingen signifikant forskjell mellom solsikker og bringebær i opptak og translokering, men det var en trend med høyere nivåer i solsikker enn bringebær.

Opptak av fremmedstoffer via røtter og translokering i planter influeres av opptak og forbruk av vann (transpirasjon). Transpirasjon, ofte gitt som L vann per dag, inngår som input-parameter i noen opptaksmodeller for organiske kjemikalier i planter (Trapp, 2004; Fantke et al., 2012). Transpirasjon påvirkes av en rekke faktorer; for eksempel miljøfaktorer som luftfuktighet, lufttemperatur, jordtemperatur, vanntilgjengelighet og vindhastighet samt planterelaterte faktorer som for eksempel rotutvikling og bladoverflate.

For en del faktorer er det ikke en entydig forklaring hvordan de innvirker på transpirasjonen. For eksempel så vil vind til et visst punkt øke transpirasjonen men blir vindhastigheten for høy, vil transpirasjonen reduseres. I tillegg vil for eksempel temperatur, lys og nedbør/vanning innvirke på nedbrytning- og avrenning av imidakloprid og dermed halveringstidstiden i vekstmedie. Forholdene i veksthusforsøk er konstante mens i friland vil de kunne ha stor variasjon.

Jordvolum vil være forskjellig for planter som dyrkes i potter i forhold på friland og det vil innvirke på både jordfuktighet og plantefysiologiske prosesser. Vi har dyrket plantene i vekstrenner (6 m) og slik sett vil vekstforholdene være mer lik på friland enn i potteforsøk.

Som drøftet ovenfor vil det ikke være et entydig svar på om det vil være forskjell - og om det vil være høyere enn lavere - i imidakloprid-konsentrasjonen i nektar- og pollen om denne studien hadde vært utført på friland istedenfor i veksthus.

5. Konklusjon

Formålet med prosjektet var å undersøke om planter som vokser i planteavfall eller kompost med rester av imidakloprid kan ta opp og translokere imidakloprid til nektar og pollen i konsentrasjoner som kan medføre uheldig eksponering av pollinerende insekter.

Forsøket viste at høyeste imidakloprid-konsentrasjon i nektar og pollen fra bringebær og solsikke som vokste i veksttorv med en imidakloprid-konsentrasjon rundt $28 \mu\text{g/g}$ TS, var henholdsvis $109,6 \text{ ng/g}$ og $79,3 \text{ ng/g}$ (solsikke) og $131,8 \text{ ng/g}$ og $26,4 \text{ ng/g}$ (bringebær).

Med antagelsen at det er lineær sammenheng mellom konsentrasjonen i vekstmedie og opptak og translokering til nektar og pollen vil vi, ut fra denne studien, kunne anslå at høyeste beregnet konsentrasjon i nektar og pollen i planter som vokser i kompost/planteavfall med $7 \mu\text{g/g}$ TS (høyeste målte konsentrasjon) å være $33,0 \text{ ng/g}$ i nektar og $19,8 \text{ ng/g}$ i pollen.

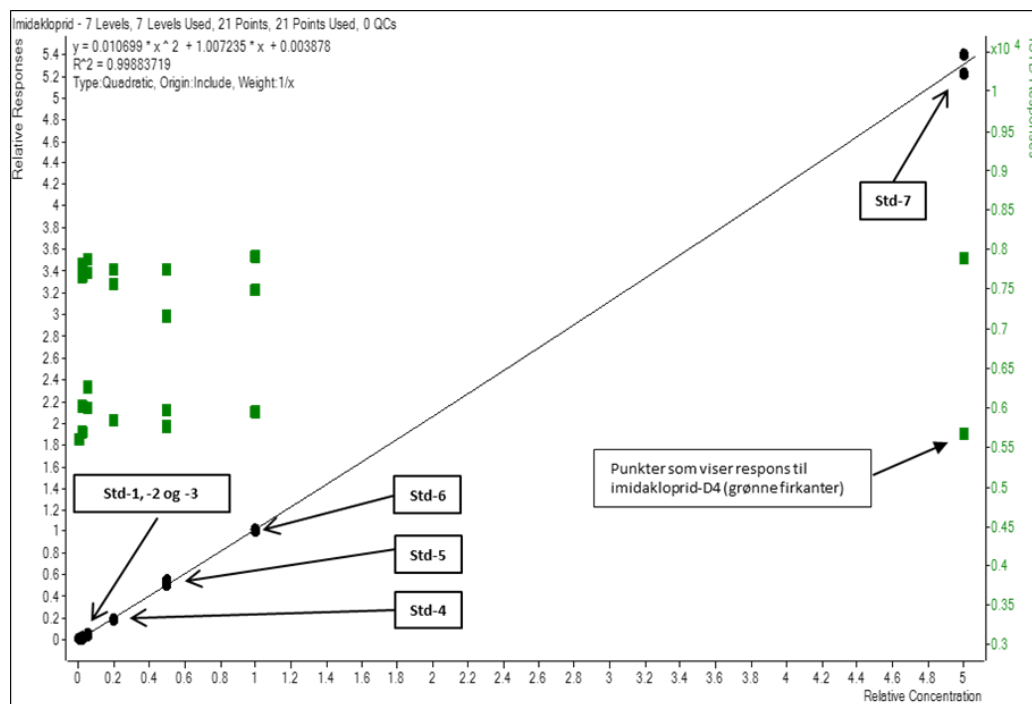
Studien viser at det er behov for mer kunnskap om hvorvidt veksthusavfall kan inneholde imidakloprid-nivåer som kan utgjøre en lokal kilde for uheldig påvirkning av honningbier og også villbier.

6. Referanser

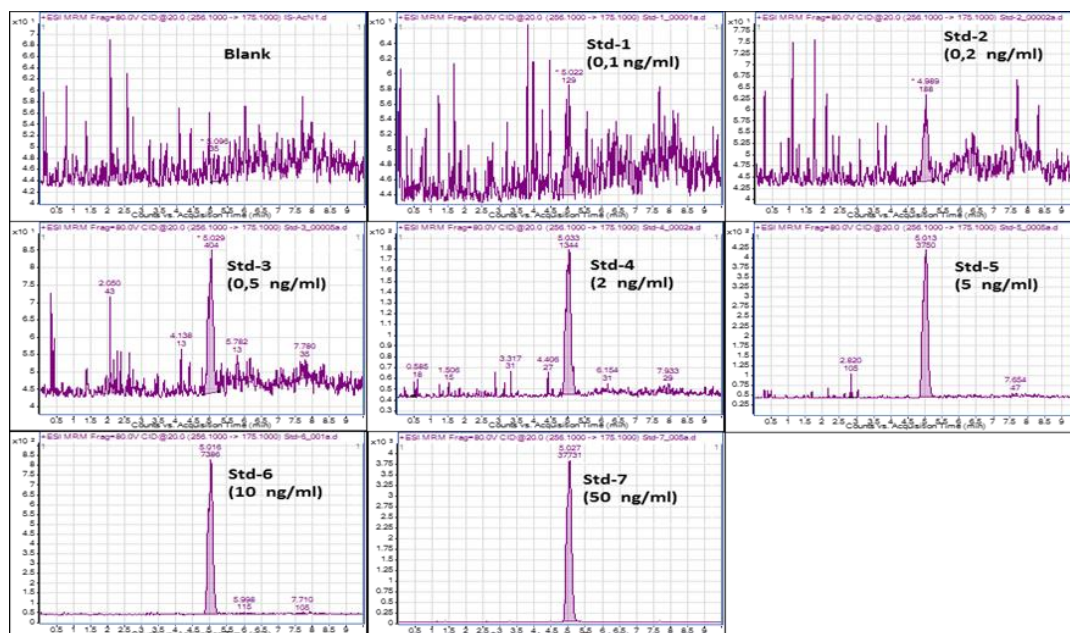
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenk, F.J. (2003). "Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction for the Determination of Pesticide Residues in Produce." *J.AOAC Int* **86**: 412-431.
- Beyond Pesticides Factsheet. ChemicalWatch Factsheet. Imidacloprid.
<http://www.beyondpesticides.org/pesticides/factsheets/Imidacloprid.pdf>
- Blackquière, T., Smagghe, G., van Gestel, C.A.M., Mommaerts, V. (2012). "Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment." *Ecotoxicology* DOI **10.1007/s10464-012-0863**.
- Chauzat, M. P., Martel, A.C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., Aubert, M., Carpentier, P., Faucon, J.P. (2011). "An assessment of honey bee colony matrices, *Apis mellifera*, to monitor pesticide presence in continental France." *Environ. Tox. Chem.* **30**: 103-111.
- Cox L, Koskinen, W., Celis, R., Yen, P., Hermosin, M., Cornejo, J. (1998a) Sorption of imidacloprid on soil clay mineral and organic components. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **62**:911-915.
- Cox L, Koskinen, W., Yen, P. (1998b) Influence of soil properties on sorption-desorption of imidacloprid. *J. Environ. Sci. Health.* **B33**:123-134.
- EEA/Maxim, L. & van der Sluijs, J. 2013 Seed-dressing systemic insecticides and honeybees In: nnn (ed): Late lessons from early warnings: science, precaution, innovation. EEA Report No 1/2013: 401-438. doi:10.2800/70069. European Environmental Agency, Available online: <http://www.eea.europa.eu/publications/late-lessons-2>
- EFSA (2012). Scientific Opinion on the science behind the development of a risk assessment of Plant Protection Products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). *European Food Safety Authority. EFSA Journal* Parma, Italy. **10(5)**:2668.
- EFSA (2013a). Conclusion on pesticide peer review. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid. *European Food Safety Authority. EFSA Journal* 2013; **11(1)**: 3068
- EFSA (2013b). Conclusion on pesticide peer review. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. *European Food Safety Authority. EFSA Journal* 2013; **11(1)**: 3067
- EFSA (2013c). Conclusion on pesticide peer review. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin. *European Food Safety Authority. EFSA Journal* 2013; **11(1)**:3066
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3068.htm>
- Eggen, T., Odenmarck, S.R. (2012). Opptak og translokering av insektmidlet imidacloprid i kulturplanter - eksponering av bier. Bioforsk rapport Vol. 7 Nr. 169 2012
- Eggen, T., Lillo, C. (2012). "Antidiabetic II Drug Metformin in Plants: Uptake and Translocation to Edible Parts of Cereals, Oily Seeds, Beans, Tomato, Squash, Carrots, and Potatoes." *J. Agric. Food Chem.* **60** 6929-6935.
- Fantke, P., Wieland, P., Juraske, R., Shaddick, G., Seignétoiz, E., Friedrich, R., Jolliet, O. (2012). "Parameterization Models for Pesticide Exposure via Crop Consumption." *Environ. Sci. Technol.* **46**: 12864-12872.
- Fossen, M. (2006). Environmental Fate of Imidacloprid. C. D. o. P. Regulaon.
<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/Imidclprdfate2.pdf>.
- Krupke, C. H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G., Given, K. (2012). "Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields." *PLoS One* **7(1)**: e29268.

- Laycock, I., Lenthall, K.M., Barratt, A.T., Cresswell J.E. 2012. Effects of imidakloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). *Ecotoxicology* 21(7);1946, on-line: doi: 10.1007/s10646-012-0927-y. May 2012.
- Roseth, R. (2010). Plantervernmidler i avfall fra produksjon og import av blomster. Bioforsk Rapport Vol. 5 Nr. 67.
- Roseth, R. (2012). Veksthus med produksjon av potteplanter - plantervernmidler i avrenning, avfall og grunnvann. Bioforsk Rapport Vol. 7 Nr. 26.
- Roseth, R. (2013) Avrenning av plantervernmidler og næringsstoffer (1). Gartneryrket 2/2013.
- Sanco (2011). Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document N° SANCO/12495/2011.
- Trapp, S. (2004). "Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals." Environ. Sci. Pollut. Res. 11(1): 33-39.
- USEPA (2008) United States Environmental Protection Agency. Memorandum. EFED Problem Formulation for the Regulation Review of Imidakloprid. DP Barcode: D353978. PC Code: 129099. November 13. 2008.

7. Vedlegg 1. Standardkurve



Standardkurve på syv konsentrasjonsnivåer av imidakloprid korrigert med imidakloprid-D4. Funn av imidakloprid i prøver kvantifiseres mot standardkurve.



Kromatogrammer (MRM1) av blank og standarder av imidakloprid på syv konsentrasjonsnivåer (0.1 - 50 ng/ml).

8.Vedlegg 2. Valideringsresultater

Imidakloprid tilsatt nektar (4,6 - 74,4 ng/g)												
Nektar	Prøve	Prøvekons.	Tilsatt	Tilsatt	Tilsatt	Funnet		Imidakloprid (ng/ml)			Gjenfinning	
	g	g/ml*	ng	ng/ml*	ng/g	ng/ml	ng/g	Snitt	SD	RSD	ng/ml	Snitt
VN00-ubh	0,074	0,371	0,0	-	-							
VN01-Level-1	0,062	0,311	0,5	2,50	8,05	2,31	7,45	2,50	0,153	6,1 %	92 %	100 %
VN02-Level-1	0,052	0,260	0,5	2,50	9,62	2,55	9,83				102 %	
VN03-Level-1	0,109	0,546	0,5	2,50	4,58	2,70	4,95				108 %	
VN04-Level-1	0,068	0,339	0,5	2,50	7,39	2,39	7,07				96 %	
VN05-Level-1	0,071	0,355	0,5	2,50	7,04	2,55	7,17				102 %	
VN06-Level-2	0,084	0,422	5,0	25,00	59,24	25,78	61,10	25,3	0,75	2,9 %	103 %	101 %
VN07-Level-2	0,071	0,356	5,0	25,00	70,32	25,96	73,03				104 %	
VN08-Level-2	0,067	0,336	5,0	25,00	74,40	24,91	74,13				100 %	
VN09-Level-2	0,076	0,380	5,0	25,00	65,79	24,17	63,60				97 %	
VN10-Level-2	0,079	0,393	5,0	25,00	63,61	25,64	65,24				103 %	
											Gjenfinning	
											ng/ml	Snitt
											92 %	
											102 %	
											108 %	100 %
											96 %	
											102 %	
											103 %	
											104 %	
											100 %	
											97 %	
											103 %	

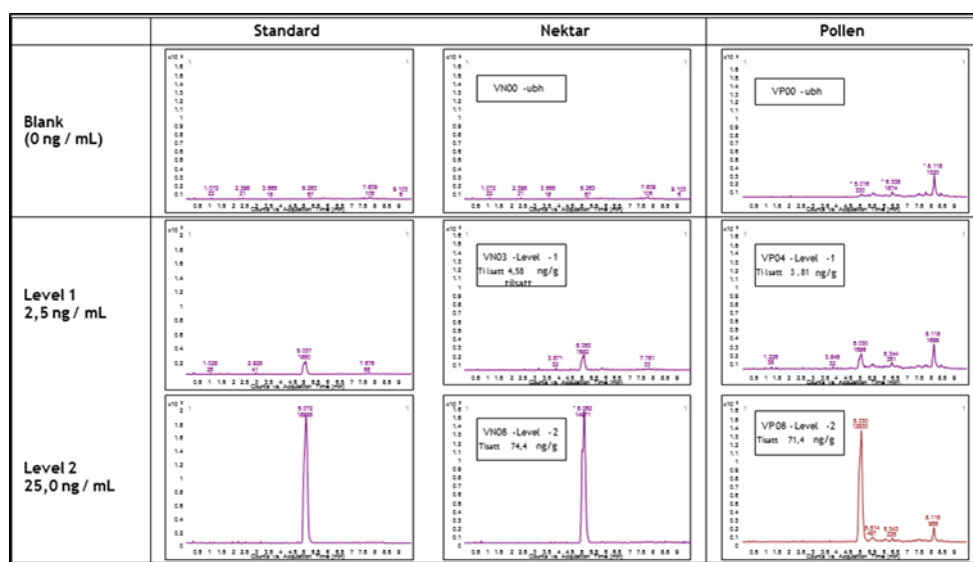
Imidakloprid tilsatt pollen (3,8 - 71,4 ng/g)														
Pollen	Prøve	Prøvekons.	Tilsatt	Tilsatt	Tilsatt	Funnet		Imidakloprid (ng/ml)			Gjenfinning			
	g	g/ml*	ng	ng/ml*	ng/g	ng/ml	ng/g	Snitt	SD	RSD	ng/ml	Snitt		
VP00-ubh	0,106	0,53	0,0	-	-	0,60	1,13							
VP01-Level-1	0,094	0,47	0,5	2,50	5,30	2,49	5,29	2,89	0,243	8,4 %	100 %	116 %		
VP02-Level-1	0,109	0,55	0,5	2,50	4,58	2,94	5,39				118 %			
VP03-Level-1	0,073	0,36	0,5	2,50	6,88	2,86	7,87				114 %			
VP04-Level-1	0,131	0,66	0,5	2,50	3,81	3,08	4,69				123 %			
VP05-Level-1	0,100	0,50	0,5	2,50	5,02	3,09	6,21				124 %			
VP06-Level-2	0,102	0,51	5,0	25,0	49,2	24,7	48,6	25,3	1,00	3,9 %	99 %			
VP07-Level-2	0,105	0,53	5,0	25,0	47,6	24,6	46,8				98 %			
VP08-Level-2	0,070	0,35	5,0	25,0	71,4	24,8	71,0				99 %		101 %	
VP09-Level-2	0,128	0,64	5,0	25,0	39,2	27,0	42,3				108 %			
VP10-Level-2	0,096	0,48	5,0	25,0	52,1	25,2	52,5				101 %			
											Gjenfinning			
											ng/ml	Snitt		

Beregninger gjøres på stoffkonsentrasjon ng/mL da prøvekonsentrasjonen varierer.

* Konsentrasjon i 0,200 ml opparbeidet prøve.

Resultatene er korrigert med imidakloprid-D4 tilsatt standarder og prøver.

Valideringsdata for imidakloprid tilsatt nektar og pollen på to nivåer.



Kromatogrammer (MRM1) av blank, standarder og tilsetninger av imidakloprid til nektar og pollen i validering.

9. Vedlegg 3. Statistikk vurdering

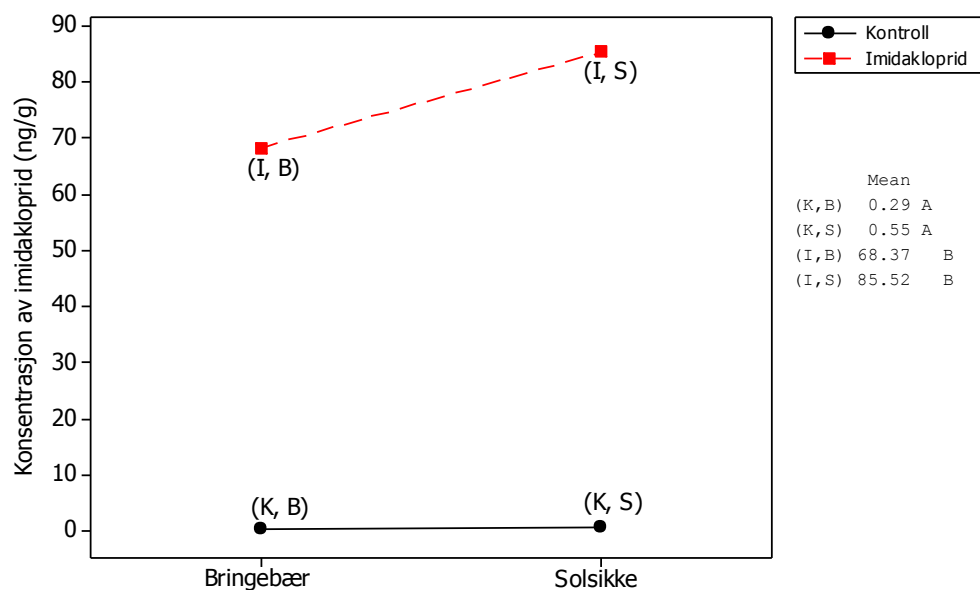
Statistisk modellering og analyse av dataene viser signifikante forskjeller ($p < 0.05$) mellom planter dyrket i imidakloprid-behandlede renner og planter dyrket i renner uten tilsatt imidakloprid (kontroll). For nektar er det signifikant forskjell i imidakloprid konsentrasjon mellom planter dyrket i vekstmedie med imidakloprid og planter dyrket i vekstmedie uten tilsatt imidakloprid (kontroll). Denne forskjellen synes å være noenlunde lik for bringebær og solsikke.

Når det gjelder pollen var det for solsikke signifikant forskjell i konsentrasjonen av imidakloprid mellom planter dyrket i imidakloprid-behandlede renner og planter dyrket i renner uten tilsatt imidakloprid (kontroll). For bringebær ble ingen tilsvarende signifikant forskjell påvist mellom planter dyrket i imidakloprid-behandlede renner og planter dyrket i renner uten tilsatt imidakloprid (kontroll). Situasjonen er vist i figur 7.

Forsøket viser en trend, men ikke signifikant effekt, at solsikkepollen har høyere opptak og translokering av imidakloprid enn bringebær.

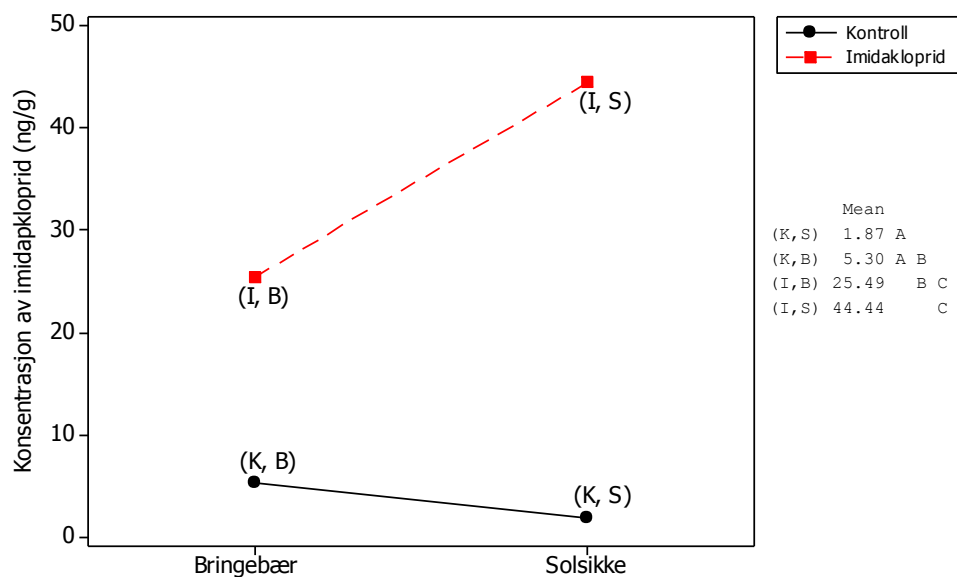
Interaksjonsplot for nektar

Tilpassede verdier



Interaksjonsplot for pollen

Tilpassede verdier



Interaksjonsplot som viser påvist konsentrasjon av imidakloprid for kontroll, imidakloprid-behandling, bringebær og solsikke. Grupper med samme bokstav (A, B eller C) kan ikke påstås å være signifikant ulike (Tukey's multiple sammenligningsmetode).